

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57—159710

⑬ Int. Cl.³
A 61 K 31/335
31/415

識別記号
ADB
ADB

庁内整理番号
6408—4C
6408—4C

⑭ 公開 昭和57年(1982)10月1日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑮ 抗真菌性殺菌剤

⑯ 特 願 昭56—44708

⑰ 出 願 昭56(1981)3月28日

特許法第30条第1項適用 昭和56年1月25日
発行日本抗生物質学術協議会「THE・JAPANESE・JOURNAL・OF・AN

TIBIOTICS」第34巻第1号に発表

⑱ 発 明 者 柳下弘毅

東京都足立区千住1—3—4

⑲ 発 明 者 陣内英昭

東京都世田谷区下馬4—8—9

⑳ 出 願 人 柳下弘毅

東京都足立区千住1—3—4

明 細 書

1. 発明の名称 抗真菌性殺菌剤

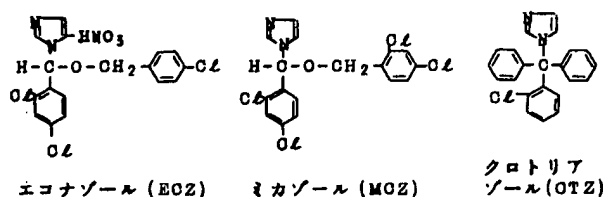
2. 特許請求の範囲

2,15-ジヒドロキシ-7-メチル-5-オキソ-6-オキサビシクロ〔11,3,0〕ヘキサデカ-3,11-ジエンとイミダゾール系抗真菌性化合物との組合せを活性成分として含有することを特徴とする、抗真菌性殺菌剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明は新規且つ特定の組合せを活性成分としてなる抗真菌性殺菌剤に関する。

従来ある種のイミダゾール系化合物は若干の抗真菌性作用のあることが知られている。例えばエコナゾール (Econazole、以下「EOZ」と略称す)、ミカゾール (Miconazole、以下「MOZ」と略称す)、クロトリアゾール (Clotriazole、以下「OTZ」と略称す) はそれぞれ下記の構造式

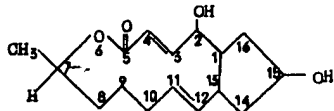


で示されるイミダゾール系化合物であり、後に表示するようにキャンディイダ菌に対して6~25 μg/ml程度の最小抑制濃度を有するものである。しかしながら現実の用途に対してはこれらの抗真菌性作用は満足なものとはいえない。

一方、本発明者等は東京都世田谷区下馬の土壌から分離した青カビ菌属 Y-11950 菌株(以下本菌株という)から分離した抗生物質〔以下場合に依り「SYN」(synergicidin)と称する〕についてその構造および生物学的性状を研究したところ、前記 SYN 物質が2,15-ジヒドロキシ-7-メチル-5-オキソ-6-オキサビシク

ロ〔11.3.0〕ヘキサデカ-3,11-ジエンであることを確認すると共に、その SYN 物質単独ではキャンディダ属菌株に対して非実用的程度の抗真菌作用を有しないにかかわらず前述のイミダゾール系化合物と組合せて使用すると両者単独の場合からは到底予想されない抗真菌作用を有することを見出して本発明を完成するに至つた。従つて本発明は SYN 物質とイミダゾール系化合物との組合せを有効成分としてなる抗真菌剤である。

本発明における一成分たる SYN 物質は化学名 2,15-ジヒドロキシ-7-メチル-5-オキソ-6-オキサビシクロ〔11.3.0〕ヘキサデカ-3,11-ジエンであり、構造式



油エーテルには不溶性である。SYN の急性毒性 $LD_{50} > 250 \text{ mg/kg}$ (in mice (i.p.)) であり低毒性を示し、抗腫瘍性効果としてヒーラ細胞 (HeLa cells) に対する形態学的変性効果を試験した結果は、 0.122 mg/ml 以上の濃度で変性が観察され、HeLa cells に対する抗腫瘍性効果が認められた。また SYN 物質の抗菌スペクトルを示すと次のとおりであつた。

第 1 表

SYN の寒天平板希釈法による抗菌スペクトル

菌 種	最小阻止濃度 ($\mu\text{g/ml}$)
(ハードインヒュージョン寒天培地)	
スタフィロコッカス・アウレウス (<i>Staphylococcus aureus</i>) 209P ATCC6538P	> 100
スタフィロコッカス・アウレウス・テラジマ (<i>Staphylococcus aureus</i> Terajima)	> 100
スタフィロコッカス・アウレウス・スミス (<i>Staphylococcus aureus</i> Smith)	> 100
バチルス・メガテリウム (<i>Bacillus megaterium</i>)	> 100

に相当する。このものの紫外吸収は $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}: 218 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max}}^{0.1\text{N HCl}}: 204 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max}}^{0.1\text{N NaOH}}: 222 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}: 208 \text{ nm}$ を示し、赤外吸収 $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr cm}^{-1}}: 3350 (-\text{OH})$, 2915 around (C-H), 1708 (C=O), 1640 (C=O), 1443 (OH₂), 1380 (OH₂), 1254, 1110, 1075, 1000, 983, 974 を示し、Mass スペクトルからは m/e 280 (M^+) が得られる。旋光度 $[\alpha]_D^{20} +10.623^\circ$ (C=0.33, MeOH) であり、融点は 200°C である。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは $\delta_{\text{TMS ppm}}: 1.17 (3\text{H, d, OH-CH}_3)$, 1.5~2.0 (10H, m, OH₂), 2.3 (1H, m, >OH-OH=CH), 3.8~4.2 (2 または 3H, m, OH), 4.44 (1H, d, CH-OH), 4.7 (1H, m, OH-CH₃), 5.06 (1H, d, OH-OH), 5.18 (1H, dd, O-OH=CH) である。SYN の理化学的性質は、メタノール、エタノール、n-ブタノール、酢酸エチル、クロロホルム、アセトン、ベンゼン、ジオキサンおよびデメチルスルホキシドに溶解し、エチルエーテルおよび水には難溶性であり、石

バチルス・アントラシス (<i>Bacillus anthracis</i>)	> 100
バチルス・ズブテリス (<i>Bacillus subtilis</i>) NRRL B-558	> 100
サルシナ・ルテア (<i>Garcina lutea</i>) POI 1001	> 100
マイクロコッカス・フラバ (<i>Micrococcus flava</i>) M-16	> 100
マイクロコッカス・ルテウス (<i>Micrococcus luteus</i>) BC2495	> 100
エシエリシア・コリ (<i>Escherichia coli</i>)	> 100
サルモネラ・チフイムリウム (<i>Salmonella typhimurium</i>) 1406	> 100
サルモネラ・パラタイフィ (<i>Salmonella paratyphi</i>) A	> 100
サルモネラ・パラタイフィ (<i>Salmonella paratyphi</i>) B	> 100
シゲラ・フレクスネリ (<i>Shigella flexneri</i>)	> 100
シゲラ・ボイディ (<i>Shigella boydii</i>)	> 100
シゲラ・ゾンネイ (<i>Shigella sonnei</i>)	> 100
クレブシエラ・ニューモニアエ (<i>Klebsiella pneumoniae</i>) POI 602	> 100

プロテウス・ブルガリス (<i>Proteus vulgaris</i>) OX-19	> 100	トルラ・ウチリス (<i>Torula utilis</i>)	100
シユードモナス・エルギノザ (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	> 100	サツカロマイセス・サケ (<i>Saccharomyces sake</i>)	100
シユードモナス・エルギノザ (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) 8011049	> 100	サツカロマイセス・セレビシアエ (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	> 100
シユードモナス・フルオレスセンス (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	> 100	クリプトコッカス・ネオホルマンス (<i>Cryptococcus neoformans</i>)	100
シユードモナス・タバシ (<i>Pseudomonas tabaci</i>)	> 100	カンジダ・アルビカンス (<i>Candida albicans</i>) Yu 1200	25
シユードモナス・ソラナシアルム (<i>Pseudomonas solanacearum</i>)	> 100	カンジダ・アルビカンス (<i>Candida albicans</i>) 805314	25
マイコバクテリウム・ツベルクロシス (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) 607	> 100	カンジダ・トロピカリス (<i>Candida tropicalis</i>)	25
マイコバクテリウム・フレイ (<i>Mycobacterium phlei</i>)	> 100	カンジダ・シユードトロピカリス (<i>Candida pseudotropicalis</i>)	25
(サブロー・グルコース寒天培地)		カンジダ・ステラトイデア (<i>Candida stellatoidea</i>)	625
ペニシリウム・クリソゲナム (<i>Penicillium chrysogenum</i>)	> 100	キサントモナス・オリザエ (<i>Xanthomonas oryzae</i>)	> 100
アスペルギルス・ニガー (<i>Aspergillus niger</i>)	50	キサントモナス・シトリ (<i>Xanthomonas citri</i>)	> 100
トリコフイトン・メンタグロフイテス (<i>Trichophyton mentagrophytes</i>)	> 100	上述した SYN 物質は「Nature」第 181 巻第 1072~3 頁 (1958 年) および「Agr. Biol. Chem.」	
ハンセスラ・アノモラ (<i>Hansenula anomala</i>)	> 100		

第 28 (2) 巻 77~81 頁 (1964 年) に言及された decumbiu, 「Helv. Chim. acta」第 46 巻第 1235~44 頁 (1963 年) および同第 47 巻第 1401~15 頁 (1964 年) に記載された brefeldin A、および「Agr. Bioe. Chem.」第 34 (5) 巻第 395~413 頁 (1970 年) に記載された ascotoxin と同一であることを本発明者らは確認している。従つて SYN 物質と略称した 2,15-ジヒドロキシ-7-メチル-5-オキソ-6-オキサピシクロ [11,3,0] ヘキサデカ-3,11-ジエンは現在例えば Brefeldin A の名称でスイス国サンド社から商業的に入手できる。

本発明によれば、SYN 物質はイミダゾール系化合物と 0.01:1~1:1 の割合で組合わされる。このようにして組合わせると、それぞれ単独の場合に比してキャンディダ属菌に対して 100 倍近い最小抑制濃度の増強がみられる。今 SYN

物質と ECZ、MCZ および CTZ のそれぞれとの組合せの最小抑制濃度をそれら単独の場合と対比して示すと第 2~4 表のとおりである。

第 2 表

カンジダ属菌	SYN 単独 の MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	ECZ 単独 の MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	SYN+ECZ (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
カンジダ・アルビカンス Yu1200	25	125	0.20
カンジダ・アルビカンス 805314	25	125	0.20
カンジダ・トロピカリス	25	25	0.20
カンジダ・シユードトロピカリス	25	313	0.20
カンジダ・ステラトイデア	625	0.20	0.20*

註 * : SYN+ECZ (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の MIC

使用培地 : サブロー・グルコース寒天

第 3 表

カンジダ属菌	BYN単独 のMIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	MCZ単独 のMIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	BYN+MCZ (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)の MIC($\mu\text{g}/\text{ml}$)
カンジダ・アルビカンスYu1200	25	125	0.39
カンジダ・アルビカンスBC5314	25	25	0.39
カンジダ・トロピカリス	25	25	0.39
カンジダ・シムードトロピカリス	25	625	0.39
カンジダ・ステラトイデア	625	0.20	0.20*

註 * : BYN+MCZ (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の MIC

使用増地 : サブロー・グルコース寒天

第 4 表

カンジダ属菌	BYN単独 のMIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	CTZ単独 のMIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	BYN+CTZ (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)の MIC($\mu\text{g}/\text{ml}$)
カンジダ・アルビカンスYu1200	25	25	0.20
カンジダ・アルビカンスBC5314	25	25	0.39
カンジダ・トロピカリス	25	25	0.20
カンジダ・シムードトロピカリス	25	625	0.39
カンジダ・ステラトイデア	625	0.20	0.10*

註 * : BYN+CTZ (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の MIC

使用増地 : サブロー・グルコース寒天

の含有量の化学的測定は BYN 物質は青かび系菌株の液体培養液の減圧下通過、乾燥によつて分取したシロップ状物から Candida 属菌による増地上での阻止円法力価検定法によつて検定され、イミダゾール系化合物は高純品の希釈液について含有量の含量測定により製剤化後の濃度が検定され、それら両者の配合比率は各等量ならびに 1 : 3 ~ 3 : 1 の比率が適当と考えられるが、製剤による皮膚疾患部への外用塗布および皮下および静脈内または経口投与のいわゆる in vivo における試験では in vitro の 2 ~ 3 倍の比率の巾が示され、1 : 10 ~ 10 : 1 の変動比率が適している。

実施例 1 (家畜飼料および果実の貯蔵剤用製剤例)

青カビ属菌株を液体増地中で $30 \pm 5^\circ\text{C}$ の濃度で振盪培養して得たブrossを通過し次いで伊

上記データから判るとおり、BYN 物質はそれ単独ではさしたる顕著な抗真菌作用を示さないが、それが ECZ、MIZ または OTZ のようなイミダゾール系化合物に対して組合された場合には予想外に高い相乗的作用が発揮されるものであり、従つて BYN 物質は特にキャンディダ属菌に対してイミダゾール系化合物の相乗剤として有用なものである。

本発明における BYN 物質とイミダゾール系化合物との組合せは当業者には既知の処方技術に従つて処方してヒトまたは動植物におけるキャンディダ属菌により惹起される例えば水疱性瘰癧、汗疱状または爪甲などの白癬諸皮膚症、とこずれその他真菌性肺臓感染症、婦人科系諸疾患などの障害の克服に使用される。

本発明の有効成分である、BYN 物質 ECZ、MOZ および OTZ などの既知のイミダゾール系化合物

液を濃縮して BYN 物質 5.6% を含有する濃縮液 1000 cc を予め風乾水分 2% を含有する粒径 300 メッシュの微粉陶土 1 kg と風乾水分 2.7% を含有する超微粉状コロイド珪酸 0.5 kg および製剤用微粉タルク (風乾水分 2.4%) 0.5 kg とを均一に混合後攪拌し、ついで希釈剤を収めた横街式リボン羽根付混合機の薬液注入孔を通じて加圧噴霧した後 3 時間攪拌を継続し生ずる団粒を完全に微粉化せしめた後 $50 \pm 5^\circ\text{C}$ の風乾機内で乾燥せしめ、約 1.960 kg の水和粉剤を得た (BYN の力価は Bioassay の結果 0.26% の BYN を含有していた)。本剤 1 g およびソルビトール系非イオン界面活性剤 10 cc とを 1000 L の清水に溶解し、粗砕した風乾牧草のサイロ積込み作業中にベルトコンベアの投入孔上に均一に噴霧する。

実施例 2 (外用軟膏剤使用製剤例)

手 続 補 正 書

昭和56年11月5日

特許庁長官 島 田 春 樹 殿

白色ワセリン、白ろう、オリーブ油を配剤した疎水性軟膏基剤（融点45℃）を加温液化し、BYNおよびEOZ、MOZまたはOTZなどのイミダゾール化合物の高純品とを1:3～3:1の給比率に混溶してキャンディダ属菌罹患動物体皮膚上に塗布して使用する。

特許出願人 柳 下 弘 毅

代 理 人 弁 理 士 山 下



1. 事件の表示

昭和56年特許願第 44708 号

2. 発明の名称

抗真菌性殺菌剤

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都足立区千住1-3-4

氏名称 柳 下 弘 毅

4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区麹町3丁目2番地（相互第一ビル）

電話 (261) 2022

氏 名 (6256) 山 下 白



5. 補正命令の日付（自発）

昭和56年11月5日

6. 補正の対象

明細書第4項の発明の詳細な説明の欄

7. 補正の内容

- 1) 第4頁下から第2行の「デメテル」を「ジメテル」と補正します。
- 2) 第5頁第5行の「mg/ml」を「μg/ml」と補正します。
- 3) 第9頁第2行の「decumbiu」を「decumbin」と補正し、同頁第5行の「B100。」を「B101.」と補正します。
- 4) 第10頁第2表の最右欄の見出し中「(1 μg/ml)」を「(各1 μg/ml)」と補正し、同表註欄の「(0.05 μg/ml)」を「(各0.05 μg/ml)」と補正します。
- 5) 第11頁第3表の最右欄の見出し中「(1 μg/ml)」を「(各1 μg/ml)」と補正し、同表註欄の「(0.05 μg/ml)」を「(各0.05 μg/ml)」と補正します。
- 6) 第11頁第4表の最右欄の見出し中「(1

μg/ml)」を「(各1 μg/ml)」と補正し、同表註欄の「(0.05 μg/ml)」を「(各0.05 μg/ml)」と補正します。

- 7) 第14頁第12～14行の「本剤1g……に溶解し、」を「本剤およびEOZの濃度がそれぞれ0.2～5 μg/mlとなるように、ソルビール系のノニオン界面活性剤濃度0.03～0.3%を含有する清水液中に加えて希釈し、」と補正します。

以 上